

食水系感染症病原体の検査法 - 2

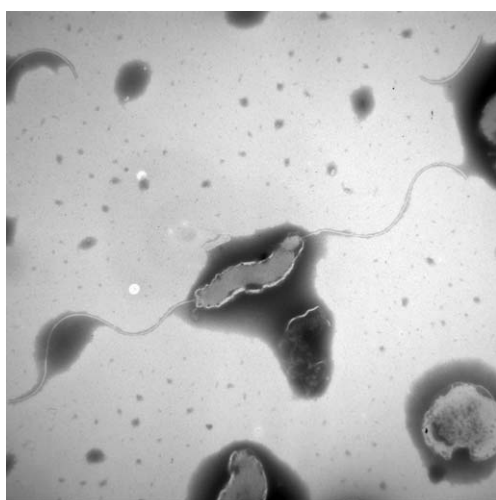
カンピロバクター

おの かず あき
小野 一 晃
Kazuaki ONO

I. 病原体について

1. 病原体

図1に *Campylobacter jejuni* の電子顕微鏡写真を示す。カンピロバクター属菌は $0.2 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 大の細いらせん (S字) 状にわん曲したグラム陰性桿菌で、一端または両端に一本の鞭毛をもち、コルク栓抜き様運動を呈する。芽胞は形成しないが、長時間の培養や環境の変化に応じて菌形態が“らせん状”から“球状”に変化する。菌の増殖には酸素濃度が3～15%の微好気環境を必要とし、発育温度はおおむね $25 \sim 42^\circ\text{C}$ であるが、菌種により異なる。2005年現在、17菌種が知られているが、このうちカンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*) とカンピロバクター・コリ (*C. coli*) の2菌種が食中毒菌に指定されている。



— 500nm

図1 *C. jejuni* 電子顕微鏡写真

2. 疫学

①日本や世界における発生状況

図2に厚生労働省ホームページ (全国食中毒発生状況) より集計した、わが国のカンピロバクター食中毒の発生件数 (1998～2007年) を示す。1998年以降、毎年400～600件発生しているが、2003～2005年にかけてと2007年は、事件数において、サルモネラなど他の食中毒菌やノロウイルスによるものを抜いて第1位であった (2006年はノロウイルスが第1位)。その多くが患者1人の事例であるが、近年、患者2人以上の事例も増えている。

日本以外の先進国においてもカンピロバクター腸炎の発生件数は増加しており、わが国と同様、生または調理不十分な食肉の摂食による事例が多くみられるが、その他には生乳の摂取による事例や水系感染事例が多い。

②感染源や感染経路

カンピロバクター属菌は、家畜、家禽、伴侶動物、野生動物などの腸管内に広く認められ、これら保菌

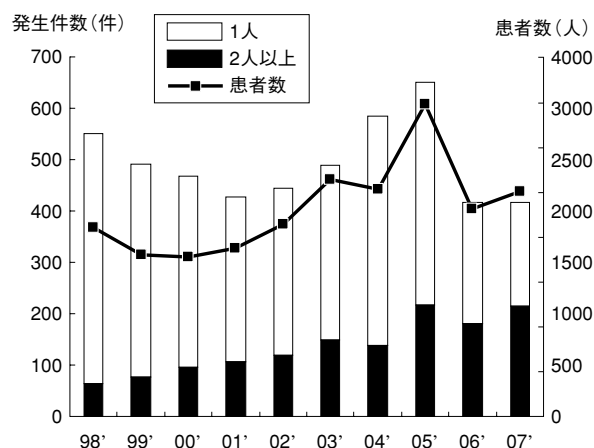


図2 わが国のカンピロバクター食中毒発生件数と患者数 (1998～2007年)

食水系感染症病原体の検査法 - 2

動物が感染源である。また、これら動物により汚染された河川や下水などの環境材料からも菌が分離される。ヒトへの感染経路の主なものとして、1) 生または調理不十分な食肉あるいは内臓の摂取、2) 食肉などから二次汚染を受けた食品の摂取、3) 未殺菌の飲料水、あるいは野生動物などにより汚染された環境水の摂取、4) 保菌動物との接触の4つが考えられる。

③主な原因食品

本菌による食中毒は、食品を喫食してから発症するまでの潜伏期間が比較的長く(2～5日)原因食品が残っていないこと、また、仮に残っていたとしても、(冷凍)保存期間中に菌が死滅・減少し、食品からの菌分離が難しいことなどの理由から、原因食品を特定するのが困難である場合が多い。

しかし、過去の食中毒事例において原因食品が明らかとなった(推定も含む)ものの多くは鶏料理であり、鳥の刺身・たたき、鶏わさ・レバー刺しなど、生または半生状態で摂取するものや、焼き鳥、焼き肉など加熱不足の鶏肉の摂取によるものが挙げられる。また、生の肉から野菜など他の食品が二次汚染を受けて感染した例もみられる。鶏料理に次いで、焼き肉(鶏肉以外)や牛レバー刺しによる事例が多くみられる。その他、沢水や井戸水、あるいは簡易水道水などの消毒不備による水系感染例もある。

3. 臨床症状

カンピロバクター食中毒の潜伏期間は、一般に2～5日と他の細菌性食中毒の場合に比べて長く、平均2～3日である。また、臨床症状としては、下痢、腹痛、発熱、頭痛、悪寒、嘔吐などの症状を示し、まれに合併症として敗血症、菌血症、髄膜炎などの他、腸炎の1～3週後に四肢の筋力低下、歩行困難などの運動麻痺を主徴とするギラン・バレー症候群を起こすことがある。

II. 検査法

糞便、食品、飲料水、調理器具や器材の拭き取り材料などが検査対象となる。糞便は Carry-Blair などの培地に、また、食品は約 200g を滅菌袋などに

採取し、10℃以下で速やかに輸送する。試料の常温での放置および乾燥を避けることが重要である。

1. 培養法

①糞便からの菌分離法

通常、選択分離培地で直接培養を行う。5～7%のウマ脱線維溶血液を加えた、変法 Skirrow 培地 EX (日水製薬株式会社) や Butzler 培地 (Oxoid)、血液の代わりに炭末を加えた mCCDA 培地 (Oxoid) などが用いられる。また、下記に示すような液体培地での増菌培養を併用する場合もある。

②食品、拭き取り材料、飲料水からの菌分離法

選択剤を添加した Preston 培地 (Oxoid)、Bolton 培地 (Oxoid) などの液体培地で増菌培養後、選択分離培地を用いる。

食品 25g に増菌培養液 100ml を加えてストマッカーで攪拌後、全量を微好気状態 (O_2 : 約 5%) で培養する方法²⁾(大量培養法)と、簡便法として、増菌培養液 100ml (抗生剤と血液を添加しない) に試料 25g を入れ、ストマッカーで攪拌後、増菌培養液 10ml を中試験管に採り、所定の抗生剤と血液を添加する方法²⁾もある。増菌培養後、選択分離培地で培養を行う。一方、冷凍された試料など、菌の損傷が考えられる食品を対象とする場合は、Bolton 培地による増菌培養液を 37℃、4 時間、微好気条件下で前培養後、42℃、24～44 時間、微好気培養を行い、損傷菌の回復を図る方法が推奨されている²⁾。Bolton 培地は選択性が弱く、大腸菌など他の菌の発育により目的菌の分離が困難な場合があり、著者らは冷凍状態で販売されている輸入鶏肉の検査において、本培地で 24 時間培養後、培養液の 1ml を Preston 培地へ接種する二段階増菌法を報告している⁸⁾。

この他、拭き取り材料は、増菌培養液 10ml に接種し、42℃、24～48 時間、微好気培養し、次いで選択分離培地で培養する。また、飲料水は 1～2L 程度をメンブランフィルター (0.20 μ m) でろ過し、ろ紙を増菌培養液 10ml に接種し、同様に培養する。

③スクリーニング試験

図 3 に mCCDA 培地上に発育した集落を示す。48 時間培養後には、直径 2～3mm の灰色を帯びた扁平な集落を示す。カンピロバクターが疑われる集落

から、懸滴標本を作成し、位相差顕微鏡（800～1,000倍）で観察する。カンピロバクターはS字状やらせん状の形態を示し、コルク栓抜き様運動をする。

以上の形態および運動性検査でカンピロバクターが疑われた場合には、オキシダーゼ試験を行い、陽性であることを確認する。

④確認試験

カンピロバクターが推定されたら、コロンビア血液寒天培地（Oxoid）などに塗抹し、純培養を行ってから（図4）、1) 好氣的発育、2) 25℃および42℃での発育、3) カタラーゼ試験、4) 酢酸インドキシル加水分解試験、5) 馬尿酸塩加水分解試験、6) ナリジクス酸（30μg）とセファロチン（30μg）に対する感受性試験などにより生化学的性状を調べる。

表1に主なカンピロバクター属菌の生化学的性状を示す。*C. jejuni*と*C. coli*は、オキシダーゼ陽性、硝酸塩還元、硫化水素（TSI培地）非産生、酢酸インドキシル加水分解陽性などの類似した生化学的性状を示すが、両者は馬尿酸塩加水分解能の違いから区別される（図5）。*C. jejuni*は陽性（左側）、*C. coli*は陰性（右側）である。しかし、*C. jejuni*の中には馬尿酸塩加水分解能が弱い株もあることから、本性状試験で鑑別できない場合には、下記に示すような遺伝子診断法により、*hip* 遺伝子（hippuricase gene）の有無を確認する必要がある。

また、各種生化学的性状からカンピロバクター属の菌種を同定するキットとして、アピヘリコ（日本バイオメリュー株式会社）などが市販されている。



図3 mCCDA 培地

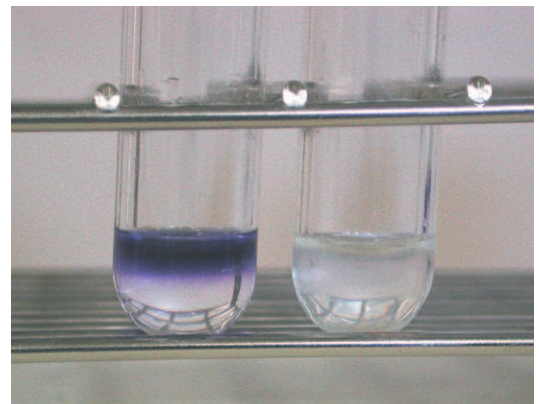


図4 コロンビア血液寒天培地

表1 主なカンピロバクター属菌の生化学的性状

| 菌種 | カタラーゼ | 硝酸塩還元 | 亜硝酸塩還元 | 発育 | | 硫化水素 (TSI培地) | 馬尿酸塩加水分解 | 酢酸インドキシル | ナリジクス酸 | セファロチン |
|-------------------------------------|-------|-------|--------|-----|-----------------|--------------|----------|----------|-----------------|--------|
| | | | | 25℃ | 42℃ | | | | | |
| <i>C. jejuni</i> | + | + | - | - | + | - | + | + | S ¹⁾ | R |
| <i>C. coli</i> | + | + | - | - | + | - | - | + | S ¹⁾ | R |
| <i>C. lari</i> | + | + | - | - | + | - | - | - | R | R |
| <i>C. upsaliensis</i> | W | + | - | - | + | - | - | + | S | S |
| <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> | + | + | - | + | - ²⁾ | - | - | - | R | S |
| <i>C. hyointestinalis</i> | + | + | - | + | + | + | - | - | R | S |

+: 陽性, -: 陰性, W: 弱陽性, S: 感受性, R: 耐性
 1) 耐性株もみられる 2) 42℃で発育可能な菌株もある



C. jejuni (陽性) *C. coli* (陰性)

図5 馬尿酸塩加水分解試験

食水系感染症病原体の検査法 - 2

2. 遺伝子診断法

① PCR 法

カンピロバクター (*C. jejuni*, *C. coli* など) の検査に用いられる主な PCR 法について、検出対象とする遺伝子、プライマー、検出条件などを表 2 に示す。

②リアルタイム (real-time) PCR

PCR 産物の増幅を蛍光シグナルとしてリアルタイムに検出し、指数増加期の蛍光を測定することにより、目的遺伝子の定量を行う方法が開発されている。

本法は、サイバーグリーン (SYBR Green) など二本鎖 DNA を認識する蛍光物質を利用するイン

ターカレーション法と TaqMan プローブなどによるハイブリダイゼーション法に大別される⁶⁾。後者は、アニーリング過程で目的とする PCR 産物にハイブリダイズした TaqMan プローブが、伸長反応で分解され、クエンチャー (蛍光物質の発する蛍光を消光する物質) による抑制が解除されると蛍光を発する。

カンピロバクター (*C. jejuni*) の検査に用いられる主なリアルタイム PCR 法を表 3 に示す。このうち、Fukushima ら¹⁾、Wolffs ら¹²⁾ の報告は、密度勾配遠心により、食品検体から目的菌を分別 (濃縮) したサンプルをリアルタイム PCR 法で検出する方法である。この他にも、TaqMan プローブ法による *Campy-*

表 2 菌種同定に用いられる主なプライマーと反応条件

| 対象菌種 | 標的遺伝子 | プライマー | 反応条件 | 増幅産物 | 文 献 |
|---|---------------|--|--|-------|-----------------------|
| <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i> | 16S rRNA | 5'-CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG-3' (forward) 5'-TTC TGA CGG TAC CTA AGG AA-3' (reverse) | 94℃ (2分)→94℃ (30秒)、58℃ (15秒)、 72℃ (30秒):35サイクル→72℃ (4分) | 287bp | Lubeckら ⁵⁾ |
| <i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> | 16S rRNA | 5'-AAT CTA ATG GCT TAA CCA TTA-3' (forward) 5'-GTA ACT AGT TTA GTA TTC CGG-3' (reverse) | 94℃ (1分)、58℃ (1分)、 72℃ (1分):25サイクル | 854bp | |
| <i>C. jejuni</i> | <i>hipO</i> | 5'-GAA GAG GGT TTG GGT GGT G-3' (forward) 5'-AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3' (reverse) | 94℃ (1分)、66℃ (1分)、 72℃ (1分):25サイクル | 735bp | Lintonら ⁴⁾ |
| <i>C. coli</i> | aspartokinase | 5'-GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G-3' (forward) 5'-ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG-3' (reverse) | 94℃ (1分)、60℃ (1分)、 72℃ (1分):25サイクル | 500bp | |
| <i>C. jejuni</i> | <i>hipO</i> | 5'-ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC-3' (forward) 5'-GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC-3' (reverse) | 95℃ (6分)→95℃ (30秒)、59℃ (30秒)、 72℃ (30秒):30サイクル→72℃ (7分) | 323bp | |
| <i>C. coli</i> | <i>glyA</i> | 5'-GTA AAA CCA AAG CTT ATC GTG-3' (forward) 5'-TCC AGC AAT GTG TGC AAT G-3' (reverse) | 〃 | 126bp | |
| <i>C. lari</i> | <i>glyA</i> | 5'-TAG AGA GAT AGC AAA AGA GA-3' (forward) 5'-TAC ACA TAA TAA TCC CAC CC-3' (reverse) | 〃 | 251bp | Wangら ¹⁰⁾ |
| <i>C. upsaliensis</i> | <i>glyA</i> | 5'-AAT TGA AAC TCT TGC TAT CC-3' (forward) 5'-TCA TAC ATT TTA CCC GAG CT-3' (reverse) | 〃 | 204bp | |
| <i>C. fetus</i> | <i>sapB2</i> | 5'-GCA AAT ATA AAT GTA AGC GGA GAG-3' (forward) 5'-TGC AGC GGC CCC ACC TAT-3' (reverse) | 〃 | 435bp | |

表 3 *C. jejuni* 同定に用いられる主なプライマーとプローブ

| 検出法 | プライマーおよびプローブ | 反応条件 | 文 献 |
|-----------------|--|--|---|
| TaqMan プローブ法 | 5'-CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG-3' (forward) 5'-TTC CTT AGG TAC CGT CAG AA-3' (reverse) 5' FAM-TGT CAT CCT CCA CGC GGC GTT GCT GC-TAMRA 3' (probe) | 初期変性:95℃ (3分) 2 step PCR:95℃ (15秒)、 58℃ (60秒)→40サイクル | Josefsenら ³⁾ |
| | 5'-CTG AAT TTG ATA CCT TAA GTG CAG C-3' (forward) 5'-AGG CAC GCC TAA ACC TAT AGC T-3' (reverse) 5' FAM-TCT CCT TGC TCA TCT TTA GGA TAA ATT CTT TCA CA-TAMRA 3' (probe) | 初期変性:50℃ (5分)→95℃ (10分) 2 step PCR:95℃ (20秒)、 60℃ (1分)→40サイクル | Nogvaら ⁷⁾ |
| | 5'-TTG GTA TGG CTA TAG GAA CTC TTA TAG CT-3' (forward) 5'-CAC ACC TGA AGT ATG AAG TGG TCT AAG T-3' (reverse) 5' FAM-TGG CAT ATC CTA ATT TAA ATT ATT TAC CAG GAC-TAMRA 3' (probe) | 初期変性:50℃ (2分)→95℃ (10分) 2 step PCR:95℃ (15秒)、 60℃ (1分)→45サイクル | Sailsら ⁹⁾ |
| SYBR Green法 | 5'-TGG GTG CTG TTA TAG GTC GT-3' (forward) 5'-GCT CAT GAG AAA GTT TAC TC-3' (reverse) | 初期変性:95℃ (10分) PCR:95℃ (5秒)、 60℃ (20秒)→35サイクル 72℃ (25秒) 融解曲線分析 | Fukushimaら ¹⁾ (プライマーは Wilsonら ¹¹⁾) |
| | 5'-CTG CTT AAC ACA AGT TGA GTA GG-3' (forward) 5'-TTC TGA CGG TAC CTA AGG AA-3' (reverse) 5'-GGA AAC CCT GAC GCA GCA-fluorescein 3' (probe1) 5' LCred640-GCC GCG TGG AGG ATG AC-3' (probe2) | 初期変性:95℃ (1分) PCR:95℃ (10秒)、 58℃ (10秒)→40サイクル 融解曲線分析 | Wolffsら ¹²⁾ |

表4 食品からの免疫学的手法による主なカンピロバクター検出キット

| 検出法 | キット* | 発売元 |
|-----------------|-------------------------|--------------|
| 酵素抗体法 (ELISA 法) | カンピロバクター Visual イムノアッセイ | アヅマックス株式会社 |
| イムノクロマト法 | シングルパス カンピロバクター | メルク株式会社 |
| 自動測定機器 | バイダス アッセイキット キャンピロバクター | 日本ビオメリュー株式会社 |
| | PATHATRIX カンピロバクター | プライムテック株式会社 |

*いずれも食品を増菌培地で1～2日培養後のサンプルを使用

lobacter jejuni detection kit (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)などが市販されている。

③ LAMP 法

LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法により、*C. jejuni* (Oxidoreductase gene) および *C. coli* (Aspartate kinase gene) を対象とした、カンピロバクター検出試薬キット(栄研化学株式会社)が市販されている。

本キットは専用の測定装置を用いることにより、電気泳動をせずに、核酸の増幅反応から検出までを同一反応チューブ内で行うことができ、短時間 (LAMP 反応時間は約 1 時間) での判定が可能である。

3. 簡易・迅速診断法

食品検体からの免疫学的手法による主なカンピロバクター検出キットを表4に示す。この他、培養法により選択分離培地上に発育した集落について、スライドラテックス凝集反応による簡易・迅速診断用キットとして、F-カンピロ「生研」(デンカ生研株式会社)やドライスポットカンピロバクター(関東化学株式会社)などが市販されている。

文 献

- 1) Fukushima, H., Katsube, K., Hata, Y., Kishi, R. and Fujiwara, S.: Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**: 92-100, 2007.
- 2) 伊藤 武: 食品衛生検査指針 微生物編. カンピロバクター, p.225-235, 日本食品衛生協会 2004.
- 3) Josefsen, M., H., Jacobsen, N. R. and Hoorfar, J.: Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant *Campylobacters*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **3588-3592**, 2004.
- 4) Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J. and Stanley, J.: PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrhetic samples. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 2568-2572, 1997.
- 5) Lubeck, P. S., Wolffs, P., On, S. L. W., Ahrens, P., Radstrom, P and Hoorfer, J.: Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: assay development and analytical validation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 5664-5669, 2003.
- 6) 森澤啓子: 改訂 PCR 実験ノート, リアルタイム (real-time) PCR, p.62-64, 羊土社, 2005.
- 7) Nogva, H., K., Bergh, A., Holck, A. and Rudi, K.: Application of 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **4029-4036**, 2000.
- 8) 小野一晃, 安藤陽子, 柳川敬子, 中川俊夫: 二段階増菌による輸入鶏肉からのカンピロバクター分離法の検討, *日本食品微生物学雑誌*, **130-133**, 2007.
- 9) Sails, A., D., Fox, A., J., Bolton, F., J., Wareing, D., R., A. and Greenway, D., L., A.: A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 1383-1390, 2003.
- 10) Wang, G., Clark, C., G., Taylor, T., M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D., L. and Rodgers, F., G.: Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*, *J. Clin. Microbiol.*, **40**: 4744-4747, 2002.
- 11) Wilson, D., L., Abner, S., R., Newman, T., C., Mansfield, L., S. and Linz, J., E.: Identification of Ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay, *J. Clin. Microbiol.*, **3971-3978**, 2000.
- 12) Wolffs, P., Norling, B., Hoorfar, J., Griffiths, M. and Radstrom, P.: Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken samples by using flotation prior to real-time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 5759-5764, 2005.